CORSO DI STUDIO: *LM-54 Scienze Chimiche*

ANNO ACCADEMICO: *2023-2024*

DENOMINAZIONE DELL'INSEGNAMENTO: *Chimica Analitica Strumentale 8 CFU*

Principali informazioni sull'insegnamento	
Anno di corso	1° anno
Periodo di erogazione	2° semestre (04-03-2024/14-06-2024)
Crediti formativi universitari (CFU/ETCS):	8 CFU
SSD	CHIM/01 – Chimica Analitica
Lingua di erogazione	Italiano
Modalità di frequenza	Raccomandata

Docente	
Nome e cognome	Tommaso Cataldi
Indirizzo mail	*tommaso.cataldi@uniba.it*
Telefono	0805442015
Sede	Dipartimento di Chimica (UNIBA) – stanza n. 14 (piano rialzato)
Sede virtuale	https://urly.it/3x0g6
Ricevimento	Lunedi-mercoledì-venerdì in presenza o per via telematica previo appuntamento con orario da concordare per posta elettronica

Organizzazione della didattica			
Ore			
Totali	Didattica frontale	Pratica (laboratorio)	Studio individuale
200	48	24	128
CFU/ETCS			
8	6	2	

Obiettivi formativi	• Gli obiettivi formativi del corso sono di fornire i principi e le applicazioni della spettrometria di massa (MS), sia di tipo basilare che avanzato (spettrometria di massa ad alta risoluzione e accuratezza), e gli aspetti di base e applicativi della metabolomica oggetto di specifiche esperienze di laboratorio, previa formazione in aula all'uso di software di ricerca dedicato. Fornire le basi per identificare specie chimiche come proteine, peptidi, lipidi, ecc. con l'uso di banche dati e per le determinazioni quantitative delle sostanze di interesse. Al termine del corso, lo studente dovrebbe essere in grado di: • prevedere l'approccio MS più appropriato, in termini di rapporto potenzialità/costi, per la risoluzione di problemi analitici complessi; • di valutare criticamente l'esito delle ricerche effettuate con software bioinformatici; • Stabilire lo strumento più appropriato per affrontare e risolvere un problema analitico.
Prerequisiti	Fortemente consigliata la conoscenza dei principi della Chimica Analitica, cromatografia, conoscenza della Fisica, soprattutto per quanto attiene all'elettromagnetismo.

Metodi didattici	Le lezioni frontali servono per fornire agli studenti le basi teoriche dell'analisi chimica mediante la spettrometria di massa (MS). Per rendere le lezioni più coinvolgenti, si utilizza un approccio integrato che combina lezioni frontali, video e attività di apprendimento attivo. Questo approccio consente agli studenti di acquisire le conoscenze teoriche e le capacità di pensiero critico necessarie per rendere l'apprendimento della MS più interessante e stimolante. Il laboratorio è importante per consentire agli studenti di mettere in pratica le conoscenze teoriche; gli studenti possono eseguire una varietà di esperimenti con sorgenti ESI, APCI, e APPI per analisi in flusso e MALDI per analisi su piastra MALDI-MS per identificare e quantificare le sostanze presenti in campioni reali.

Risultati di apprendimento previsti ***Da indicare per ciascun Descrittore di Dublino (DD=*** ***DD1* Conoscenza e capacità di comprensione** ***DD2* Conoscenza e capacità di comprensione applicate** ***DD3-5* Competenze trasversali**	***Descrittore di Dublino 1****: conoscenza e capacità di comprensione* Al termine dell'insegnamento lo studente dovrà essere in grado di: • descrivere i principi e le basi della spettrometria di massa. • identificare quale sorgente utilizzare (ESI, APCI, APPI, ICP, MALDI, ICP, DART, ecc.) e quale analizzatore è più adatto all'analisi di un campione. • utilizzare la spettrometria di massa per risolvere problemi scientifici e tecnologici. • applicare le conoscenze di spettrometria di massa in diversi campi, come la medicina, l'ambiente, l'industria e la ricerca. • sviluppare le capacità di comunicazione scientifica e di lavoro di squadra. • utilizzare la spettrometria di massa come strumentazione analitica. ***Descrittore di Dublino 2****: capacità di applicare conoscenza e comprensione* Al termine dell'insegnamento lo studente dovrà essere in grado di: • Definire la spettrometria di massa e i suoi obiettivi. • Descrivere le sorgenti, gli analizzatori e i detector impiegate nella spettrometria di massa. • Scegliere la strumento (sorgente-analizzatore-detector) più appropriato per un determinato problema. • Eseguire il riconoscimento qualitativo che quantitativo di una sostanza. • Interpretare uno spettro di massa. • Scrivere un rapporto scientifico che abbia previsto l'impiego della spettrometria di massa. - ***Descrittore di Dublino 3-5****: capacità critiche e di giudizio* Al termine dell'insegnamento lo studente dovrà essere in grado di: • Sviluppare e utilizzare la spettrometria di massa per risolvere problemi scientifici e tecnologici. • Applicare le conoscenze e le abilità analitiche della spettrometria di massa per stabilire la presenza di metaboliti primari e secondari in campioni di esseri viventi animali e vegetali. • Comunicare le proprie conoscenze e abilità in modo efficace a un pubblico sia specialistico che non specialistico. • Lavorare in modo efficace in un gruppo e con altri professionisti. • Sviluppare capacità di apprendimento continuo e di adattamento al cambiamento.

Contenuti di insegnamento (Programma)	Spettrometria di massa (MS): terminologia di base per descrizione di uno spettro di massa. Introduzione alla MS. Cenni storici. Panoramica della MS; MS è una scatola nera? Breve cenno alle tecniche di ionizzazione in MS. Cosa fornisce uno spettro di massa: il valore m/z. Rappresentazione di uno spettro a barre o in profilo. Caratteristiche di uno spettrometro di massa: sensibilità; rapporto segnale/rumore; limite di rilevazione e di quantificazione. Thomson e la misura del rapporto m/z dell'elettrone. Termini e definizioni IUPAC in MS. Massa nominale, massa esatta (teorica) e massa accurata degli isotopi naturali. Distribuzioni isotopiche. Formula chimica, massa nominale, massa esatta e massa accurata di una sostanza. Distribuzioni isotopica del carbonio. Tecniche di ionizzazione. Confronto fra ionizzazione in fase gassosa e per desorbimento. Ionizzazione soft e hard. Requisiti di pressione e proprietà auspicabili per le sorgenti di ionizzazione. Libero cammino medio degli ioni in fase gassosa. Tecnologia del vuoto: pompe rotative, turbo molecolari e a diffusione a olio. Ionizzazione elettronica (EI): introduzione. Caratteristiche di emissione da filamento in EI. Aspetti correlati all'energia elettronica. Scala temporale della ionizzazione elettronica. Efficienza di ionizzazione e sezione collisionale. Trasferimento di energia e tipi di ioni in EI: molecolari, prodotto e metastabili. Distribuzione dell'energia interna. Effetti termodinamici e cinetici in EI. Influenza della struttura molecolare. Teoria del quasi-equilibrio (QET). Ioni metastabili. Effetto degli eteroatomi in EI. Pro e contro della ionizzazione elettronica. Database per la ionizzazione elettronica. Regola dell'azoto. Indice di deficienza da idrogeno. Ionizzazione Chimica (CI): generalità. Sorgenti CI. Ionizzazione chimica per ioni positivi (PICI). Self-CI. Uso del metano come reagente gassoso in CI. Energetica della protonazione. Effetto della temperatura della sorgente. Altri reagenti gassosi in CI. Ionizzazione chimica per scambio di carica (CE-CI). Ionizzazione chimica per ioni negativi (NICI). Cattura di elettroni in NICI: generalità ed energetica. Cattura di elettroni per risonanza, dissociativa e con formazione di coppie ioniche. Formazione di ioni negativi mediante reazioni ione-molecola: trasferimento di protone, scambio di carica, addizione nucleofila, sostituzione nucleofila. Confronto fra le sensibilità di EI, PICI e NICI. Ionizzazione chimica per desorbimento (DCI). Caratteristiche degli analizzatori di massa: analizzatori a scansione e senza scansione. Range di massa, trasmissione ionica, velocità di scansione, risoluzione. Errore di massa e accuratezza di massa, ciclo utile (duty cycle), velocità di acquisizione dati e tandem MS. Analizzatori di massa a quadrupolo (filtro di massa): equazioni di Mathieu e diagrammi di stabilità. Risoluzione di massa di un quadrupolo. Confronto tra risoluzione e intensità del segnale. Discriminazione di massa dei quadrupoli. Ponti ionici. Esapoli e ottapoli. Rilevazione: metodi per rilevare gli ioni: coppa di Faraday, moltiplicatori di elettroni secondari (serie di dinodi e channetron), fotomoltiplicatori. Micro moltiplicatori di elettroni in serie (MCP). Modalità di scansione di uno spettrometro di massa: scan mode e monitoraggio degli ioni selezionati (SIM). Trappole ioniche quadrupolari tridimensionali (3D-QIT): geometria e diagrammi di stabilità. Funzionamento di una trappola ionica 3D: intrappolamento e raffreddamento degli ioni. Caricamento della trappola con automatic gain control (AGC). Scansioni basate su instabilità selettiva sulle masse. Calcolo dell'intervallo di masse, del Low Mass Cut Off (LMCO) e delle frequenze secolari degli ioni. Eccitazione di ioni per risonanza. Effetti spazio-carica e modulazione assiale. Espulsione di ioni per risonanza. Approcci per l'isolamento di ioni in trappola ionica. Stadi di un esperimento MS/MS condotto in una trappola ionica tridimensionale. Pro e contro delle trappole ioniche tridimensionali. Trappole ioniche lineari (LIT):

	descrizione generale e voltaggi applicati. Stadi di un esperimento MS/MS condotto in una trappola ionica lineare. Confronto fra trappole ioniche tridimensionali e lineari. Esperimenti MS multi-evento con strumenti a trappola ionica lineare. Analizzatori di massa a tempo di volo (ToF): effetto sulla risoluzione della dispersione temporale, spaziale ed energetica nel corso della ionizzazione. Equazione per il tempo di volo in condizioni reali. Calibrazione. MALDI-ToF-MS: aspetti generali, delayed extraction, focalizzazione energetica e miglioramento della risoluzione mediante reflectron. Range dinamico di un TOF. Analizzatori TOF con accelerazione ortogonale. Tandem MS nei sistemi TOF. Spettrometria di massa a risonanza ionica di ciclotrone con trasformata di Fourier (FTICR-MS): cella ICR, moti ionici ciclotronico, di intrappolamento e magnetron. Sequenza di eventi in una misura FT-ICR-MS. Eccitazione a banda larga e risoluzione. Misure MS/MS in FT-ICR-MS: modalità di eccitazione ionica. Tandem MS negli FTICRMS: IRMPD ed ECD. Spettrometri ibridi LIT/FT-ICR-MS. Analizzatore di massa Orbitrap: iniezione degli ioni, frequenze caratteristiche, moto ionico orbitale. Risoluzione a confronto: FTICR-MS e Orbitrap-MS. Analizzatori di massa a settore magnetico. Spettrometro di massa a focalizzazione semplice. Settore elettrostatico e analizzatore a doppia focalizzazione. Equazioni del moto. Scansione del voltaggio o del campo magnetico. Geometria dei sistemi a doppia focalizzazione: BE ed EB. Magneti con laminazione radiale. Ionizzazione Elettrospray (ESI): cenni storici e stadi fondamentali del processo. Requisiti della fase mobile. Analogia fra un'interfaccia ESI e una cella elettrochimica. Generazione di ioni in fase gassosa in ESI-MS: fissione colombiana ed evaporazione ionica. Tipo di ioni e spettri di peptidi e proteine in ESI-MS. Relazione fra ioni in soluzione e ioni in fase gassosa. Riduzione della carica ionica a seguito di interazioni in fase gassosa o decomposizione indotta da collisione (CAD). Studio ESI-MS di composti non covalenti. Aspetti quantitativi in ESI-MS. Passaggio da ESI-MS convenzionale a nano-ESI-MS. Vantaggi, svantaggi e applicazioni generali dell'ESI-MS. Confronto fra ESI-MS e altre tecniche di ionizzazione. Desorption electrospray ionization (DESI-MS). Configurazione di una sorgente DESI. Meccanismi di formazione degli ioni in DESI. Proprietà analitiche della DESI. Sorgenti APCI (ionizzazione chimica a pressione atmosferica) e APPI (fotoionizzazione a a pressione atmosferica). Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI)-MS: target plate, caratteristiche del laser e delle matrici. Caratteristiche delle matrici MALDI. Processo di desorbimento in MALDI-MS, MALDI "plume". Meccanismi di generazione di ioni primari: ionizzazione multi-fotone di singole molecole, energy pooling e modelli multi-centro, trasferimento di protone in stato eccitato (ESPT), reazioni di disproporzionamento, desorbimento di ioni pre-formati, ionizzazione termica. Meccanismi proposti per la ionizzazione secondaria in MALDI-MS. Intensità ed effetti di soppressione del segnale MALDI-MS. Desorbimento-ionizzazione su silicio (DIOS). Spettrometria di massa inorganica. Spettrometro di massa con sorgente al plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS). Generazione del plasma. ICPMS ad ablazione laser. Elementi da analizzare in ICP-MS. Introduzione del campione, ionizzazione. Potenziale di ionizzazione. Interfaccia tra ICP ed MS. Analizzatori a bassa ed alta risoluzione. Interferenze spettrali: isobariche, poliatomiche, a doppia carica ionica e dipendenti da matrice. Cellette di collisione. Analisi quali e quantitativa. Spettrometria di massa dei rapporti isotopici (IRMS). Isotopi stabili. Rapporti isotopici per standard di riferimento primari. Valori delta, δ, per gli standard isotopici distribuiti dall'AIEA. Abbondanza isotopica e origine geografica. Alcune "regole" generali IRMS: configurazione strumentale. Introduzione del campione. Lo spettrometro di massa Nier. Spettrometria di massa ambientale: analisi diretta in tempo reale (DART) MS. Schema di una sorgente DART: principio di funzionamento. Ionizzazione Penning.

	Processo di formazione degli ioni in una sorgente DART. Trasferimento di protoni. Formazione di ioni negativi. Applicazioni analitiche della DART. Spettrometri di massa ibridi che includono una trappola ionica quadrupolare e un analizzatore a tempo di volo: MALDI-QIT-TOF, LC-ESI-QIT-TOF. Spettrometri di massa ibridi Quadrupolo-Tempo di Volo (Q-ToF): MALDI-Q-ToF, LC-ESI-Q(q)-ToF-MS con singolo o doppio reflectron. Spettrometria di massa tandem. Applicazioni e modalità operative di analizzatori MS/MS. Product Ion Spectrum. Multiple Reaction Monitoring (MRM/SRM). Precursor Ion Scan. Constant Neutral Loss Spectrum. Strategie alternative per la frammentazione: SORICID, IRMPD, ECD. Confronto fra comuni analizzatori MS/MS. Ruolo della velocità di acquisizione nell'accoppiamento fra spettrometria di massa e tecniche cromatografiche. Spettrometria di mobilità ionica (IMS): concetti generali, metodi per l'introduzione del campione e per la ionizzazione degli analiti. Mobilità ionica: equazioni generali. Spettrometrie di mobilità ionica basate su tubo di deriva (DTIMS), onda viaggiante (TWIMS) e forma d'onda asimmetrica ad alto campo (FAIMS). Analizzatore a Mobilità Differenziale (DMA). Accoppiamento fra Spettrometria di Mobilità Ionica e Spettrometria di Massa (IMS-MS). LC-ESI-DTIMS-MS, FAIMS-MS. Applicazioni della IMS tal quale o in accoppiamento alla spettrometria di massa. Spettrometria di massa di ioni secondari (SIMS): classificazione in Dynamic e Static, rese di sputtering e di ioni secondari, quantificazione. Caricamento e profili di concentrazione. Strumentazione SIMS: configurazioni strumentali, sorgenti di ioni primari, lenti elettrostatiche e rivelatori. Uso delle sorgenti a cluster ionici e a metallo liquido in SIMS. Imaging SIMS. Fast atom bombardment (FAB)-MS: principio, sorgenti e meccanismo. Evoluzione temporale, aspetti pratici ed interpretazione degli spettri; limitazioni del FAB-MS. <u>Attività di laboratorio</u>. Il laboratorio didattico si compone di alcune esercitazioni pratiche volte al riconoscimento mediante MS, LC-MS o GC-MS di sostanze presenti in campioni reali. • Studio del pattern isotopico di una formula chimica empirica. • Identificazione di un fosfolipide (o altro metabolita) mediante ricerca in banca dati, a partire dal peso molecolare e dall'interpretazione dello spettro ESI-MS/MS. • Analisi MALDI-ToF MS ed MS/MS di un campione reale.
Testi di riferimento	J.H. Gross, Spettrometria di massa, EdiSES 2018. Articoli della letteratura scientifica segnalati a lezione.
Note ai testi di riferimento	Il corso sarà corredato dalle slide in PDF delle lezioni.
Materiali didattici	Il corso verrà erogato mediante didattica frontale con l'uso slides in PowerPoint™. Particolarmente importante è la presenza assidua alle esercitazioni di laboratorio.

Valutazione	
Modalità di verifica	È prevista la verifica dell'apprendimento alla fine del corso mediante colloquio orale sugli argomenti trattati e valutazione delle relazioni di laboratorio. Verranno formulate domande per stabilire la capacità di risolvere un problema analitico di identificazione, caratterizzazione e quantificazione mediante spettrometria di massa di una sostanza organica e inorganica. La verifica riguarderà la capacità di interpretare uno spettro di massa e il pattern isotopico di uno ione. Verrà richiesto altresì di illustrare i principi teorici e di funzionamento di sorgenti, analizzatori e detector impiegati nella spettrometria di massa organica e inorganica. La durata dell'esame è di circa 1 ora. La commissione verificherà il raggiungimento degli obiettivi formativi dell'insegnamento. Quando questi non sono raggiunti, lo studente è invitato ad approfondire lo studio e ad avvalersi di ulteriori spiegazioni da parte del docente titolare. Non sono previste prove intermedie.

Criteri di valutazione	I criteri di valutazione sono basati sulla *Conoscenza e capacità di comprensione*: • La prova finale si propone di valutare, mediante votazione in trentesimi l'acquisizione da parte dello studente di famigliarità e padronanza con i principi della spettrometria di massa, attraverso la conoscenza delle sorgenti di ionizzazione e degli analizzatori di massa che sono maggiormente utilizzati nei laboratori di analisi chimiche, biologiche, cliniche e ambientali. • La prova finale si propone di valutare la conoscenza delle basi teoriche della spettrometria di massa e del suo accoppiamento alla moderna cromatografia liquida e gassosa. *Conoscenza e capacità di comprensione applicate*: • Lo studente deve essere in grado di estrarre le informazioni utili al riconoscimento di specie chimiche attraverso il valore di massa-su-carica (m/z), il pattern isotopico e il modo di frammentazione in esperimenti di spettrometria di massa tandem. *Autonomia di giudizio*: • Lo studente deve essere in grado di individuare gli aspetti centrali dei problemi proposti e di ricondurli ai concetti fondamentali acquisiti proponendo soluzioni coerenti. L'acquisizione dell'autonomia di giudizio verrà verificata mediante la valutazione degli argomenti oggetto dell'insegnamento. • Lo studente deve essere in grado di discutere le informazioni basiche di uno spettro di massa e il principio di funzionamento fisico di analizzatori e detector. • Lo studente deve essere in grado di interpretare uno spettro di massa acquisito con strumenti a bassa o alta risoluzione/accuratezza. *Abilità comunicative*: • Lo studente grazie alle adeguate competenze e strumenti di comunicazione scritta e orale dovrà analizzare, proporre e discutere criticamente con linguaggio scientifico appropriato e con rigore di argomentazioni, un contraddittorio sulla risoluzione di un problema di analisi quali/quantitativa. *Capacità di apprendere*: • Lo studente dovrà acquisire sufficiente capacità di apprendimento e approfondimento delle principali tematiche della spettrometria di massa tramite la consultazione di materiale bibliografico in forma cartacea e/o elettronica. • La capacità di apprendimento è verificata mediante analisi delle conoscenze delle tematiche oggetto dell'insegnamento attraverso la prova orale d'esame. • Lo studente dovrà acquisire sufficiente capacità di trasferire le conoscenze di base acquisite a nuove problematiche applicative anche a carattere interdisciplinare.
Criteri di misurazione dell'apprendimento e di attribuzione del voto finale	Il voto finale è attribuito in trentesimi. La valutazione finale verrà formulata mediante colloquio nel quale verrà valutato il livello di comprensione della spettrometria di massa. La prova orale potrà comprendere la richiesta di spiegazioni teoriche alla base del funzionamento di sorgenti di ionizzazione e analizzatori di massa. La prova orale si propone di valutare la capacità generale di analisi e interpretazione critica degli argomenti oggetto della spettrometria di massa e la padronanza della materia. L'esame si ritiene superato con una votazione minima di diciotto/trentesimi. Per conseguire una valutazione elevata lo/la studente/studentessa deve avere sviluppato autonomia di giudizio e adeguata capacità di argomentazione ed esposizione. La lode verrà assegnata quando l'esame risulterà eccellente. Le date delle prove scritte saranno disponibili su Esse 3 come anche i risultati. In funzione della numerosità degli studenti, la prova orale si terrà in più turni a partire dalla data indicata su Esse3.

Altro	